

## INFLUÊNCIA DA VIA DE INOCULAÇÃO NA VIRULÊNCIA RESIDUAL DE DIFERENTES SUBAMOSTRAS DE BCG PARA CAMUNDONGOS ALBINOS (\*)

Lamartine PALHANO JUNIOR (1) e Paulo Pinto GONTIJO FILHO (2)

### RESUMO

Os Autores compararam as amostras de BCG-Brasil, BCG-Rússia e BCG-Praga quanto à virulência para camundongos, considerando-se os valores de densidade e peso pulmonar, e pesos de fígado e baço, em animais vacinados ou revacinados, através das vias endovenosa e subcutânea. Não foi possível uma diferença entre as três vacinas através do modelo utilizado. Os valores apresentados pelos camundongos inoculados por via subcutânea pouco diferiram dos controles, ao contrário do observado para os animais injetados por via endovenosa ( $p < 0,05$ ). Discute-se a importância do modelo animal utilizado no estudo da virulência das amostras, devido às divergências existentes na literatura.

### INTRODUÇÃO

O bacilo de Calmette-Guérin (BCG) tem sido considerado um dos mais efetivos estimuladores do sistema retículo endotelial (SRE). O poder antigênico das vacinas BCG produzidas nos diversos laboratórios é considerado bastante estável<sup>3</sup>, apesar da observação de algumas diferenças em suas características culturais, morfológicas e bioquímicas, bem como da capacidade de induzir resistência à tuberculose<sup>17,19</sup>. As discrepâncias encontradas nos índices de proteção contra tuberculose conferidos pela vacinação BCG nos diferentes países<sup>20</sup>, e os resultados conflitantes observados quando da sua utilização na terapêutica de tumores<sup>1,16</sup>, são difíceis de serem analisados. O emprego de diferentes vacinas BCG pode ser uma das causas<sup>13,20,21</sup>.

A virulência residual parece ser uma das propriedades mais importantes da vacina BCG, quanto à capacidade de estimular os sistemas retículo endotelial e linforreticular<sup>20</sup>. Diferenças na virulência residual das amostras de BCG foram apontadas por BUNCH-CHRISTENSEN & col.<sup>2</sup>; JESPERSEN<sup>10</sup>; LADEFOGED &

col.<sup>12</sup> e SHER & col.<sup>20</sup>. A influência da via de inoculação na virulência de três amostras BCG foi considerada nesta publicação. A virulência foi avaliada pela densidade pulmonar e pesos do pulmão, baço e fígado.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Animais** — Foram utilizados camundongos fêmeas de quatro semanas de idade, provenientes do Centro Pan-Americano de Febre Aftosa, Rio de Janeiro, mantidos em gaiolas de plástico com ração e água à vontade.

**Amostras** — Foram utilizadas as amostras de BCG Brasil (TMC — 1013), BCG Rússia (TMC-1022) e BCG Praga (TMC-1025), recebidas do "Trudeau Institute, Saranac Lake, NY, USA".

**Vacinas** — As amostras foram cultivadas no meio 7H9 de Middlebrook (Difco), contendo Tween 80 na concentração de 0,05% a 37°C, sob agitação constante durante 10-14 dias. As suspensões foram distribuídas em frascos tipo penicilina e estocadas em refrigerador a -20°C. A contagem de viáveis foi realizada a partir de

(\*) Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia da UFRJ, com recursos do CNPq (Processo 2222.0076/75 e FINEP (Convênio 527/CT)

(1) Universidade Federal do Espírito Santo

(2) Instituto de Microbiologia da UFRJ. Bolsista do CNPq

um dos frascos, utilizando-se o meio de 7H 10 de Middlebrook (Difco). Quando da vacinação dos animais, um dos frascos de cada vacina era descongelado e seu conteúdo diluído em solução de fosfatos M/15 (pH 6,8), contendo gelatina a 1%, de forma a obter as concentrações desejadas.

**Inoculação dos camundongos** — Três lotes de 30 camundongos foram vacinados pela via endovenosa com aproximadamente  $10^6$  unidades viáveis (UV)/0,2 ml, respectivamente com cada uma das vacinas. Após 28 dias, cada lote foi subdividido em grupos de dez, sendo o primeiro sacrificado pelo éter e os restantes reinoculados com a amostra homóloga, pelas vias endovenosa ( $10^6$  UV/0,2ml) e subcutânea ( $10^8$  UV/0,05 ml), respectivamente, e sacrificados após 48 horas.

Em um segundo experimento, três lotes de 20 camundongos foram inoculados por via subcutânea, com aproximadamente  $10^6$ UV/0,05ml, utilizando-se o coxim plantar da pata posterior esquerda, com cada uma das vacinas, respectivamente. Após 28 dias, cada lote foi subdividido em dois grupos de 10, sendo o primeiro sacrificado e o segundo reinoculado endo-

venosamente ( $10^6$  UV/0,2ml) e sacrificado 48 horas depois.

Grupos de 10 camundongos não inoculados foram sacrificados quando de cada experimento, como controles.

**Determinação da virulência** — A virulência residual das amostras foi avaliada pela medida da densidade pulmonar, empregando-se a técnica de CROWLE<sup>5,6</sup>, e pela determinação dos índices pulmonares, esplênico e hepático (peso do órgão/peso do animal x 100).

Os dados apontados referem-se à aritmética de 10 camundongos, e os resultados analisados estatisticamente pela comparação das médias, considerando-se como significante um valor de  $p$  inferior a 0,05 %.

## RESULTADOS

**Densidade pulmonar** (Tabela I) — Os valores obtidos nos camundongos vacinados pela via endovenosa foram de 0,850 (BCG-Brasil), 0,810 (BCG-Rússia) e 0,778 (BCG-Praga), considerados iguais entre si estatisticamente, e superiores ( $p < 0,05$ ) aos valores nos camundongos vacinados pela via subcutânea.

T A B E L A I

Influência da via de inoculação na virulência residual de diferentes amostras de *Mycobacterium bovis* BCG em camundongos, determinada pela densidade pulmonar

BCG (± 10 <sup>6</sup> UV)	Densidade Pulmonar				
	Camundongos Vacinados		Camundongos Vacinados e desafiados		
	EV	SC	EV/EV	EV/SC	SC/EV
BRASIL	0,850 ± 0,07	0,686 ± 0,01	0,942 ± 0,02	0,814 ± 0,09	0,720 ± 0,02
RÚSSIA	0,810 ± 0,10	0,704 ± 0,01	0,885 ± 0,07	0,858 ± 0,03	0,702 ± 0,02
PRAGA	0,778 ± 0,04	0,674 ± 0,01	0,878 ± 0,03	0,782 ± 0,08	0,718 ± 0,09

EV — inoculação endovenosa

SC — inoculação subcutânea no coxim plantar

Análise Estatística

Vacinados EV X Vacinados SC:  $p < 0,05$

Vacinados EV X Vacinados e desafiados EV:  $p < 0,05$  (Exceção: amostra Rússia)

Vacinados EV X Vacinados EV e desafiados SC:  $p > 0,05$

Vacinados SC X Vacinados SV e desafiados SC:  $p > 0,05$

Vacinados SC X Vacinados SC e desafiados EV:  $p > 0,05$

Com exceção da amostra russa, os camundongos vacinados endovenosamente e reinoculados pela mesma via, apresentaram valores mais altos e significantes ( $p < 0,05$ ) em rela-

ção aos animais apenas vacinados. Por outro lado, nos grupos vacinados pela via endovenosa e desafiados subcutaneamente, não se observou diferenças.

Os animais vacinados pela via subcutânea não apresentaram alteração significativa em relação aos animais normais não inoculados (0,670 a 0,690), o mesmo sendo verificado com o grupo vacinado subcutaneamente e desafiado pela via endovenosa.

**Índice pulmonar** (Tabela II) — Os resultados encontrados para BCG-Brasil e BCG-Rússia foram semelhantes estatisticamente, enquanto que os de BCG-Brasil e BCG-Praga foram diferentes ( $p < 0,05$ ) entre si.

T A B E L A II

Influência da via de inoculação na virulência residual de diferentes amostras de *Mycobacterium bovis* BCG em camundongos, determinada pelo índice pulmonar

BCG ( $\pm 10^6$ UV)	Índice pulmonar (1)				
	Camundongos Vacinados		Camundongos Vacinados e desafiados		
	EV	SC	EV/EV	EV/SC	SC/EV
BRASIL	1,97 $\pm$ 0,30	0,75 $\pm$ 0,07	2,35 $\pm$ 0,39	1,60 $\pm$ 0,25	1,22 $\pm$ 0,24
RÚSSIA	1,57 $\pm$ 0,58	0,87 $\pm$ 0,17	1,53 $\pm$ 0,13	1,39 $\pm$ 0,28	1,14 $\pm$ 0,30
PRAGA	1,15 $\pm$ 0,17	0,80 $\pm$ 0,02	1,68 $\pm$ 0,22	1,48 $\pm$ 0,26	0,86 $\pm$ 0,15

(1) — Peso do órgão/peso do animal X 100

EV — inoculação endovenosa

SC — inoculação subcutânea no coxim plantar

Análise Estatística

Vacinados EV com BCG-Brasil X Vacinados EV com BCG-Rússia:  $p > 0,05$

Vacinados EV com BCG-Brasil X Vacinados EV com BCG-Praga:  $p < 0,05$

Vacinados EV com BCG-Brasil X Vacinados e desafiados EV com BCG-Brasil:  $p < 0,05$

Vacinados EV com BCG-Rússia X Vacinados e desafiados EV com BCG-Rússia:  $p < 0,05$

Vacinados EV com BCG-Praga X Vacinados e desafiados EV com BCG-Praga:  $p > 0,05$

As amostras de BCG-Brasil e BCG-Rússia não mostraram diferenças, quando comparados os respectivos lotes vacinados por via endovenosa e os desafiados pela mesma via. Entretanto, houve diferença significante com relação aos lotes vacinados com o BCG-Praga.

**Índice esplênico** (Tabela III) — Os animais vacinados pela via endovenosa apresen-

taram índice esplênico elevado em relação aos animais controles (0,40-0,50) sem, no entanto, apresentar diferenças entre as amostras, enquanto que os vacinados subcutaneamente não forneceram nenhuma alteração. Os resultados para os lotes revacinados foram semelhantes aos de apenas vacinados.

T A B E L A III

Influência da via de inoculação na virulência residual de diferentes amostras de *Mycobacterium bovis* BCG em camundongos, determinada pelo índice esplênico

BCG ( $\pm 10^6$ UV)	Índice esplênico (1)				
	Camundongos Vacinados		Camundongos Vacinados e desafiados		
	EV	SC	EV/EV	EV/SC	SC/EV
BRASIL	1,12 $\pm$ 0,40	0,41 $\pm$ 0,09	1,58 $\pm$ 0,18	1,04 $\pm$ 0,49	0,48 $\pm$ 0,14
RÚSSIA	1,44 $\pm$ 0,25	0,50 $\pm$ 0,14	1,30 $\pm$ 0,23	1,74 $\pm$ 0,07	0,60 $\pm$ 0,20
PRAGA	1,59 $\pm$ 0,26	0,46 $\pm$ 0,25	1,60 $\pm$ 0,40	1,63 $\pm$ 0,59	0,41 $\pm$ 0,12

(1) — Peso do órgão/peso do animal X 100

EV — inoculação endovenosa

SC — inoculação subcutânea no coxim plantar

Análise Estatística

Vacinados EV com BCG-Brasil X Vacinados EV com BCG-Rússia:  $p > 0,05$

Vacinados EV com BCG-Brasil X Vacinados EV com BCG-Praga:  $p > 0,05$

Vacinados EV com BCG-Rússia X Vacinados EV com BCG-Praga:  $p > 0,05$

Vacinados EV X Vacinados e desafiados EV:  $p > 0,05$

**Índice hepático** (Tabela IV) — Com exceção do BCG-Praga que apresentava reação significativa no grupo vacinado e desafiado pela

via endovenosa em relação ao grupo apenas desafiado, de modo geral não houve comprometimento hepático de importância.

T A B E L A I V

Influência da via de inoculação na virulência residual de diferentes amostras de *Mycobacterium bovis* BCG em camundongos, determinada pelo índice hepático

BCG (± 10 <sup>9</sup> UV)	Índice hepático (1)				
	Camundongos Vacinados		Camundongos Vacinados e desafiados		
	EV	SC	EV/EV	EV/SC	SC/EV
BRASIL	7,59 ± 0,74	6,11 ± 1,26	8,33 ± 1,16	6,41 ± 0,65	6,06 ± 0,95
RÚSSIA	7,47 ± 1,48	6,54 ± 0,69	7,65 ± 1,08	8,97 ± 1,5	6,33 ± 0,52
PRAGA	7,95 ± 1,21	6,27 ± 1,84	9,97 ± 1,32	7,17 ± 1,30	6,27 ± 0,50

(1) — Peso do órgão/peso do animal X 100

EV — inoculação endovenosa

SC — inoculação subcutânea no coxim plantar

Análise Estatística

Vacinados EV com BCG-Brasil X Vacinados EV com BCG-Rússia:  $p > 0,05$

Vacinados EV com BCG-Brasil X Vacinados EV com BCG-Praga:  $p > 0,05$

Vacinados EV com BCG-Rússia X Vacinados EV com BCG-Praga:  $p > 0,05$

Vacinados EV com BCG-Brasil X Vacinados e desafiados EV com BCG-Brasil:  $p > 0,05$

Vacinados EV com BCG-Rússia X Vacinados e desafiados EV com BCG-Rússia:  $p > 0,05$

Vacinados EV com BCG-Praga X Vacinados e desafiados EV com BCG-Praga:  $p > 0,05$

## DISCUSSÃO

As vacinas BCG disponíveis no mundo variam consideravelmente na sua imunogenicidade tanto em relação ao homem quanto aos animais de experimentação<sup>7,12,13,15,18,20</sup>. Os estudos em animais relacionam as vacinas Brasil, Rússia e Copenhagen entre as mais potentes<sup>11, 12,20</sup>, enquanto as amostras BCG-Glaxo, BCG-Tóquio e BCG-Praga são as menos imunogênicas<sup>15</sup>. A baixa capacidade de induzir hipersensibilidade tuberculínica associada à fraca imunização desenvolvida em animais vacinados com BCG-Praga foram evidenciados por MACKANESS<sup>14</sup> e LADEFOGED & col.<sup>12</sup>, sendo que somente Mackaness trabalhou com camundongos.

Os resultados encontrados não confirmaram essas observações comentadas acima. As vacinas Brasil, Rússia e Praga tiveram comportamento semelhante, executando-se nos valores de índice pulmonar para os camundongos vacinados endovenosamente quando foi possível distinguir o BCG-Brasil do BCG-Praga, mas não a última amostra do BCG-Rússia. Além disso, em todos os lotes inoculados e desafiados

por via endovenosa com a BCG-Praga os valores se apresentaram aumentados em relação aos dos animais apenas vacinados, com exceção do índice esplênico, evidenciando uma boa capacidade sensibilizante.

Quando suspensões bacterianas são inoculadas diretamente no sangue, a maioria dos microrganismos é removida da circulação, predominantemente pelas células do SRE localizados no fígado, baço e outros órgãos<sup>4,10</sup>. Por outro lado, quando da utilização do coxim plantar, o gânglio linfático satélite (popliteal) retém a maior parte dos microrganismos inoculados, resultando em diferenças quantitativas pronunciadas na população microbiana retirada no fígado e baço<sup>15</sup>.

Os resultados encontrados confirmam tais observações. Os camundongos inoculados por via subcutânea pouco diferiram dos animais controles em todos os testes realizados. O mesmo foi constatado nas experiências de revacinação onde os lotes desafiados por essa via forneceram valores semelhantes aos dos apenas vacinados.

O modelo animal para o estudo da virulência de amostras de BCG deve ser considerado com atenção. A falta de concordância entre os diferentes modelos animais levanta a questão da validade dos mesmos. No entanto, vale lembrar que o camundongo está entre os animais que apresentam aproximadamente a mesma suscetibilidade do homem aos *M. tuberculosis* e BCG.

### SUMMARY

#### Effect of the route of inoculation on residual virulence of different substrains of *Mycobacterium bovis* BCG in mice

The residual virulence of BCG substrains (Brasil, Russia and Prague) were compared in mice. They were infected intravenously or subcutaneously with live bacilli Calmette-Guérin. Some of the vaccinated mice were challenged intravenously or subcutaneously. The comparisons were made on the basis of lung density and lung, liver and spleen indexes, the differences in virulence were not found among the strains. The virulence of the different strains of BCG introduced subcutaneously into mice was not significant but the intravenous route was effective ( $p < 0.05$ ). The implications of using various experimental models are discussed.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDWIN, R. W. & PIMM, M. V. — BCG immunotherapy of pulmonary growths from intravenously transferred rat tumour cells. *Brit. J. Cancer* 27: 48-54, 1973.
- BUNCH-CHRISTENSEN, K., LADEFOGED, A. & GULD, J. — The virulence of some strains of BCG for Golden Hamsters. *Bull. Wild. Hlth. Org.* 39: 821-828, 1968.
- CHAPARAS, S. E. & HEDRICK, S. R. — Comparison of strains of BCG. I — Antigenic analysis and tuberculin reactivity. *Infect. & Immunity* 7: 777-780, 1973.
- COLLINS, F. M. & MONTALBINE, V. — Relative immunogenicity of streptomycin-susceptible and-resistant strains of BCG. II — Effect of the route of inoculation on growth and immunogenicity. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 111: 43-51, 1975.
- CROWLE, A. J. — Lung density as a measure of tuberculosis involvement in mice. *Amer. Rev. Tuberc.* 77: 681-693, 1958.
- CROWLE, A. J. — Delayed hypersensitivity in mice. *J. Allergy* 30: 151-164, 1959.
- DUBOS, R. J. & PIERCE, C. H. — Differential characteristics "in vitro" and "in vivo" of several substrains of BCG. IV — Immunizing effectiveness. *Amer. Rev. Tuberc.* 74: 699-717, 1956.
- DUCAN, R. C.; KNAPP, R. G. & MILLER III, M. G. — *Introductory Biostatistics for the Health Sciences.* New York, John Wiley & Sons Inc., 1977.
- JESPERSEN, A. — The potency of BCG vaccines determined on animals. (Monography). Copenhagen, Denmark, 1971.
- LADEFOGED, A.; BUNCH-CHRISTENSEN, K. & GULD, J. — The protective effect in bank voles of some strains of BCG. *Bull. Wild. Hlth. Org.* 43: 71-90, 1970.
- LADEFOGED, A.; BUNCH-CHRISTENSEN, K. & GULD, J. — Tuberculin sensitivity in guinea-pigs after vaccination with varying doses of BCG of 12 different strains. *Bull. Wild. Hlth. Org.* 53: 435-443, 1976.
- LAGRANJE, P. H.; MILLER, T. W. & MACKANESS, G. B. — Parameters conditioning the potentiating effect of BCG on the immune response. In: *BCG in Cancer Immunotherapy.* Lamoureux, G.; Turcotte, R. & Portelance, V. (eds.). New York, Grune & Stratton, 1976.
- MACKANESS, G. B. — The Immunology of antituberculous immunity. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 97: 337-344, 1967.
- MACKANESS, G. B.; AUCLAIR, D. J. & LAGRANGE, P. H. — Immunopotentiality with BCG. I — Immune response to different strains and preparations. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1655-1667, 1973.
- MATHÉ, G.; KAMEL, M.; DESFULIAN, M.; HALLE-PANNENKO, O. & BOURUT, C. — An experimental screening system for "systemic adjuvants of immunity" applicable in cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 33: 1987-1997, 1973.
- PIERCE, C. H.; DUBOS, R. J. & SCHAEFER, W. D. — Differential characteristics "in vitro" and "in vivo" of several substrains of BCG. *J. Exp. Med.* 97: 189-206, 1956.
- PORTELANCE, V.; BOULANGER, R. P. & DURAN-LEAU-DRAGON, D. — Comparative "virulence" and antitumor activity of BCG substrains. In: *BCG in Cancer Immunotherapy.* Lamoureux, G. Turcotte, R. & Portelance, V. (eds.). New York, Grune & Stratton, 1976.
- ROSENTHAL, S. R. — *BCG Vaccination against Tuberculosis.* Boston, Little, Brown and Co., 1957.
- SHER, N. A.; CHAPARAS, S. D.; PEARSON, J. & CHIRIGO, M. — Virulence of six strains of *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *Infect. & Immunity* 8: 736-742, 1973.
- TEN DAM, H. G.; TOMAN, K.; HITZE, K. L. & GULD, J. — Present knowledge of immunization against tuberculosis. *Bull. Wild. Hlth. Org.* 54: 255-269, 1976.